

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和6年10月4日(2024.10.4)

【国際公開番号】WO2022/071417

【出願番号】特願2022-554051(P2022-554051)

【国際特許分類】

C 1 2 Q 1/00(2006.01)

C 1 2 N 9/04(2006.01)

H 0 1 M 8/16(2006.01)

H 0 1 M 4/90(2006.01)

C 1 2 N 15/53(2006.01)

C 1 2 N 15/31(2006.01)

C 1 2 Q 1/32(2006.01)

10

【F I】

C 1 2 Q 1/00 B Z N A

C 1 2 N 9/04

H 0 1 M 8/16

H 0 1 M 4/90 Y

C 1 2 N 15/53

C 1 2 N 15/31

C 1 2 Q 1/32

20

【手続補正書】

【提出日】令和6年9月26日(2024.9.26)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

30

【特許請求の範囲】

【請求項1】

フラビン化合物を補酵素とする乳酸デヒドロゲナーゼを含む組成物に、イオン性ポリマー、二糖、ジカルボン酸若しくはその塩、ポリカルボン酸若しくはその塩、リン酸若しくはその塩、モノカルボン酸若しくはその塩、単糖、トリカルボン酸若しくはその塩、テトラカルボン酸若しくはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸若しくはその塩(硫酸アンモニウムを除く)からなる群より選択されるものを1種類以上共存させる工程を含む、乳酸デヒドロゲナーゼ含有組成物の熱安定性を向上させる方法。

【請求項2】

乳酸デヒドロゲナーゼが、サッカロマイセス属、ピキア属、カンディダ属、オガタエア属、ブレタノマイセス属、シベルリンドネラ属、ハンセニアスポラ属、カザッタニア属、クワイエロマイセス属、ラチャンセア属、ナウモヴォジマ属、テトラピシスポラ属、トルラスポラ属、ヴァンデルワルトジマ属、ジゴサッカロマイセス属、ジゴトルラスポラ属、ミセリオフトラ属、サーモセロマイセエス属、カエトミウム属、又はマドゥレラ属由来の乳酸デヒドロゲナーゼである、請求項1に記載の方法。

40

【請求項3】

乳酸デヒドロゲナーゼが以下の(i)及び/または(ii)である、請求項1に記載の乳酸デヒドロゲナーゼ含有組成物の熱安定性を向上させる方法、

(i) 配列番号1、配列番号4、配列番号7、又は配列番号10に示されるアミノ酸配列との同一性が70%以上又は80%以上のアミノ酸配列を有する乳酸デヒドロゲナーゼ、

50

( i i ) 配列番号 4 の第 1 3 8 ~ 1 4 0 位、1 8 6 ~ 1 9 4 位、2 1 7 ~ 2 2 2 位、2 4 3 ~ 2 4 5 位、2 7 1 ~ 2 7 8 位、2 8 0 ~ 2 8 3 位、3 5 5 ~ 3 6 7 位、3 9 8 ~ 4 0 1 位、4 0 3 ~ 4 0 6 位及び 4 2 5 ~ 4 3 3 位のアミノ酸配列からなる相同性領域におけるアミノ酸配列と当該乳酸デヒドロゲナーゼの対応する位置の相同性領域におけるアミノ酸配列とが 8 0 % 以上又は 9 0 % 以上の配列同一性を有する乳酸デヒドロゲナーゼ。

【請求項 4】

イオン性ポリマーがアニオン性ポリマーであるか、若しくはカチオン性ポリマーである、  
カチオン性ポリマーがポリリジン、ポリエチレンイミン、メチルグリコールキトサン、及びポリ(塩化ジアリルジメチルアンモニウム)から選択される、

アニオン性ポリマーがポリアクリル酸、ヒアルロン酸、及びカルボキシメチルセルロース若しくはこれらの塩からなる群より選択される、

二糖がスクロース、トレハロース、及びマルトースからなる群より選択される、

ジカルボン酸若しくはその塩がリンゴ酸、マロン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、3 - ヒドロキシアスパラギン酸、グルタル酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、メチルマロン酸、オキサロ酢酸、酒石酸、シュウ酸、スクシン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、スベリン酸、アゼライン酸、セバシン酸、フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸、グルタコン酸、タルトロン酸、ムコン酸、メサコン酸、シトラコン酸、メコン酸、3 - 3 ' ジメチルグルタル酸、及びイタコン酸若しくはそれらの塩からなる群より選択される、

ポリカルボン酸若しくはその塩が使用される、

リン酸若しくはその塩がリン酸塩及びピロリン酸塩からなる群より選択される、

モノカルボン酸若しくはその塩がリジン、ヒスチジン、アルギニン、グリシン、グルコン酸、ロイシン酸、及び 3 - フェニル乳酸若しくはそれらの塩、からなる群より選択される、

単糖が myo-イノシトールからなる群より選択される、

トリカルボン酸若しくはその塩がクエン酸、イソクエン酸、アコニット酸、トリメシン酸、1, 2, 3 - プロパントリカルボン酸、及び 2 - ホスホノブタン - 1, 2, 4 - トリカルボン酸若しくはそれらの塩からなる群より選択される、

テトラカルボン酸若しくはその塩がエチレンジアミン四酢酸若しくはその塩から選択される、

ポリエチレングリコールが使用される、又は

硫酸が硫酸塩から選択される、

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の乳酸デヒドロゲナーゼ含有組成物の熱安定性を向上させる方法。

【請求項 5】

イオン性ポリマー、二糖、ジカルボン酸若しくはその塩、ポリカルボン酸若しくはその塩、リン酸若しくはその塩、モノカルボン酸若しくはその塩、単糖、トリカルボン酸若しくはその塩、テトラカルボン酸若しくはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸若しくはその塩(硫酸アンモニウムを除く)が溶液中において、0.01重量%から30重量%の範囲で含む、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の乳酸デヒドロゲナーゼ含有組成物の熱安定性を向上させる方法。

【請求項 6】

フラビン化合物を補酵素とする乳酸デヒドロゲナーゼ及び、イオン性ポリマー、二糖、ジカルボン酸若しくはその塩、ポリカルボン酸若しくはその塩、リン酸若しくはその塩、モノカルボン酸若しくはその塩、単糖、トリカルボン酸若しくはその塩、テトラカルボン酸若しくはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸若しくはその塩(硫酸アンモニウムを除く)からなる群より選択されるいずれか 1 種類以上の化合物を含む乳酸測定用組成物。

【請求項 7】

乳酸デヒドロゲナーゼが、サッカロマイセス属、ピキア属、カンディダ属、オガタエア

10

20

30

40

50

属、ブレタノマイセス属、シベルリンドネラ属、ハンセニアスポラ属、カザツタニア属、クルイウェロマイセス属、ラチャンセア属、ナウモヴォジマ属、テトラピシスポラ属、トルラスポラ属、ヴァンデルワルトジマ属、ジゴサッカロマイセス属、ジゴトルラスポラ属、ミセリオフトラ属、サーモセロマイセエス属、カエトミウム属、又はマドゥレラ属由来の乳酸デヒドロゲナーゼである、請求項 6 に記載の乳酸測定用組成物。

【請求項 8】

乳酸デヒドロゲナーゼが以下の ( i ) 及び / または ( i i ) である、請求項 6 に記載の組成物、

( i ) 配列番号 1、配列番号 4、配列番号 7、又は配列番号 10 に示されるアミノ酸配列との同一性が 70 % 以上又は 80 % 以上のアミノ酸配列を有する乳酸デヒドロゲナーゼ、  
( i i ) 配列番号 4 の第 138 ~ 140 位、186 ~ 194 位、217 ~ 222 位、243 ~ 245 位、271 ~ 278 位、280 ~ 283 位、355 ~ 367 位、398 ~ 401 位、403 ~ 406 位及び 425 ~ 433 位のアミノ酸配列からなる相同性領域におけるアミノ酸配列と当該乳酸デヒドロゲナーゼの対応する位置の相同性領域におけるアミノ酸配列とが 80 % 以上又は 90 % 以上の配列同一性を有する乳酸デヒドロゲナーゼ。

10

【請求項 9】

イオン性ポリマーがアニオン性ポリマーであるか、若しくはカチオン性ポリマーであり、アニオン性ポリマーがポリアクリル酸、ヒアルロン酸、及びカルボキシメチルセルロース若しくはこれらの塩からなる群より選択され、

カチオン性ポリマーがポリリジン、ポリエチレンイミン、メチルグリコールキトサン、及びポリ(塩化ジアリルジメチルアンモニウム)から選択され、

20

二糖がスクロース、トレハロース、及びマルトースからなる群より選択され、

ジカルボン酸若しくはその塩がリンゴ酸、マロン酸、グルタミン酸、アスパラギン酸、3-ヒドロキシアスパラギン酸、グルタル酸、コハク酸、マレイン酸、フマル酸、メチルマロン酸、オキサロ酢酸、酒石酸、シュウ酸、スクシン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、スベリン酸、アゼライン酸、セバシン酸、フタル酸、イソフタル酸、テレフタル酸、グルタコン酸、タルトロン酸、ムコン酸、メサコン酸、シトラコン酸、メコン酸、3-3'ジメチルグルタル酸、及びイタコン酸若しくはそれらの塩からなる群より選択され、

ポリカルボン酸若しくはその塩が使用され、

30

リン酸若しくはその塩がリン酸塩及びピロリン酸塩からなる群より選択され、

モノカルボン酸若しくはその塩がリジン、ヒスチジン、アルギニン、グリシン、グルコン酸、ロイシン酸、及び 3-フェニル乳酸若しくはそれらの塩からなる群より選択され、  
単糖が myo-イノシトールからなる群より選択され、

トリカルボン酸若しくはその塩がクエン酸、イソクエン酸、アコニット酸、トリメシン酸、1,2,3-プロパントリカルボン酸、及び 2-ホスホノブタン-1,2,4-トリカルボン酸若しくはそれらの塩からなる群より選択され、

テトラカルボン酸若しくはその塩がエチレンジアミン四酢酸若しくはその塩から選択され

ポリエチレングリコールが使用され、又は

40

硫酸が硫酸塩から選択される、

請求項 6 ~ 8 のいずれかに記載の乳酸測定用組成物。

【請求項 10】

イオン性ポリマー、二糖、ジカルボン酸若しくはその塩、ポリカルボン酸若しくはその塩、リン酸若しくはその塩、モノカルボン酸若しくはその塩、単糖、トリカルボン酸若しくはその塩、テトラカルボン酸若しくはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸若しくはその塩(硫酸アンモニウムを除く)が溶液中において、0.01重量%から30重量%の範囲で含む、請求項 6 ~ 9 のいずれかに記載の乳酸測定用組成物。

【請求項 11】

請求項 6 ~ 10 のいずれかに記載の組成物を含む乳酸測定用キット。

50

## 【請求項 1 2】

請求項 6 に記載の組成物を含む電極。

## 【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の電極を含む乳酸センサー。

## 【請求項 1 4】

請求項 1 2 に記載の電極を含む燃料電池。

## 【請求項 1 5】

乳酸デヒドロゲナーゼを電極に塗布する工程を含む電極の製造方法において、乳酸デヒドロゲナーゼの活性低下又は失活を抑制する方法であって、

- i) 乳酸デヒドロゲナーゼを含む溶液を用意する工程、  
 ii) 前記溶液に、イオン性ポリマー、二糖、ジカルボン酸若しくはその塩、ポリカルボン酸若しくはその塩、リン酸若しくはその塩、モノカルボン酸若しくはその塩、単糖、トリカルボン酸若しくはその塩、テトラカルボン酸若しくはその塩、ポリエチレングリコール、硫酸若しくはその塩（硫酸アンモニウムを除く）からなる群より選択される 1 以上の安定化剤を添加する工程、  
 iii) 前記乳酸デヒドロゲナーゼ及び前記安定化剤を含む溶液を電極に塗布する工程、  
 iv) 塗布した前記の溶液を乾燥させる工程、  
 を含む、前記方法。

10

## 【請求項 1 6】

乳酸デヒドロゲナーゼを塗布した電極が乳酸センサーに含まれる、請求項 1 5 に記載の製造方法。

20

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 6

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 6】

（ハイスルーブットスクリーニング）

L D H はさらに、機能性変異体を取得するためにハイスルーブットスクリーニングに供することができる。例えば変異導入した L D H 遺伝子を有する形質転換又は形質導入株のライブラリーを作製し、これをマイクロタイタープレートに基づくハイスルーブットスクリーニングに供してもよく、または液滴型マイクロ流体に基づく超ハイスルーブットスクリーニングに供してもよい。例としてはバリエーションをコードする変異遺伝子のコンビナトリアルライブラリーを構築し、次いでファージディスプレイ(例えば Chem. Rev. 105 (11): 4056-72, 2005)、イーストディスプレイ(例えば Comb Chem High Throughput Screen. 2008;11(2): 127-34)、バクテリアルディスプレイ(例えば Curr Opin Struct Biol 17: 474-80, 2007)等を用いて、変異 L D H の大きな集団をスクリーニングする方法が挙げられる。また Agresti et al, "Ultra-high-throughput screening in drop-based microfluidics for directed evolution" Proceedings of the National Academy of Sciences 107 (9): 4004-4009 (Mar, 2010) を参照

のこと。L D H バリエーションのスクリーニングに使用しうる超ハイスルーブットスクリーニング手法についての同文献の記載を参照により本明細書に組み入れる。例えばエラープロード P C R 法によりライブラリーを構築することができる。また飽和突然変異誘発を用いて、本明細書に記載の位置又はそれに対応する位置を標的として変異導入しライブラリーを構築してもよい。ライブラリーを用いて電気コンピテント EBY-100 細胞等の適当な細胞を形質転換し、約 10 の 7 乗の変異体を取得しうる ( $10^7$ )。これを 10 回繰り返せば約 10 の 8 乗の変異体を取得しうる ( $10^8$ )。該ライブラリーで形質転換した酵母細胞を次いでセルソーティングに供しうる。標準ソフトリトグラフィ法を用いて作製したポリジメトキシシロキサン (PDMS) マイクロ流体デバイスを用いてもよい。フローフォーカスデバイスを用いて単分散の液滴を形成することができる。個別の変異体を含む形成され

30

40

50

た液滴を適当なソーティングデバイスに供しうる。細胞を選別する際にはデヒドロゲナーゼ活性の有無を利用しうる。変異導入と選別は複数回反復してもよい。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0068】

また、これらのメディエータはポリビニルイミダゾール、ポリエチレンイミン、ポリアクリル酸などのポリマーに修飾されて用いることもできる。また、これらのメディエータはLDHに架橋試薬等を用いて固定化することもできる。参照によりこれらの全内容を本明細書に組み入れる。また、これらのメディエータは電極表面を酸処理等して活性化させた後に、電極に固定化することもできる。電極は炭素、金、白金等の素材等を用いることができる。

10

20

30

40

50